

ヘミンの酸化的開裂によるプロペントダイオペントの合成

廣 田 和 弘

Preparation of propentdyopent by the oxidative cleavage of hemin

Kazuhiro HIROTA

The methanol adduct of dimethyl ester of propentdyopent, which have two carboxyl groups on two pyrrole rings, was prepared by the oxidation of hemin with hydrogen peroxide and following esterification with a mixture of methanol and sulfuric acid. The compound was purified by the preparative column chromatography with silica gel and following recrystallization. The purity was checked by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. The compound was identified with mass and nuclear magnetic resonance spectra.

Key Words : pentdyopent, dipyrrole, hemin, hydrogen peroxide

緒 言

胆汁色素排泄異常疾患, 例えば, 黄疸患者の尿をアルカリ性亜硫酸アンモニウムで処理すると, ピンク溶液に呈色することが古くから知られている。この溶液が, 525nmの吸収をもつことから, この呈色化合物をペントダイオペント (5-2-5) と名づけ, そして, 尿中の無色の化合物をプロペントダイオペント (PDP) と呼んだ¹⁾。その後, PDP はビリルビンを光酸化して得られる分解物質の一つであることから, 新生児黄疸の光療法の生化学的見地から興味を引いた²⁾。

本著者は, 血液毒であるフェニルヒドラジンの溶血機構を研究する途上, 酸素ヘモグロビンとフェニルヒドラジンとの反応^{3), 4)}から, PDP が生成している可能性を見出した。このことを確認するため, PDP の安定な誘導体である2個のカルボキシル基をもち, メタノールが付加したジメチルエステル, すなわち下記に示すメタノールプロペントダイオペントジメチルエステル (MPDP, 2-[(3-(2-carboxyethyl)-1,5-dihydro-4-methyl-5-oxo-2H-pyrrole-2-ylidene)methyl]-2,5-dihydro-2-hydroxy-4-methyl-5-oxo-1H-pyrrole-3-

propanoic acid) の標品の取得が必要になった。

MPDP は, Schaeferら⁵⁾によって, すでに構造が決められた化合物であるが, 合成的見地からは検討されてない。ここでは, ヘミンの過酸化水素による酸化分解物質を, 硫酸を含むメタノール溶液で処理して MPDP を得る方法を検討したので報告する。

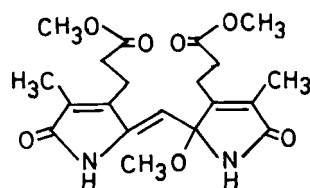


図1 メタノールプロペントダイオペントジメチルエステル (MPDP)

試薬と測定機器

試薬および溶媒は, 1級品であった。溶媒の比は容積の比で, 硫酸のパーセント表示は重量%で示した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は, Precoated plate (シリカゲル60, F-254, 厚さ0.25

mm, Merck) を用いて行った。TLC の発色に用いる Stokvis 試薬は、ハイドロサルファイトナトリウムを20%KOH 溶液に飽和させて調製した。分取カラムクロマトグラフィーは、高速液体クロマトグラフ (LC-5A, 島津製作所) のポンプと紫外吸収検出器 (280EL, 大岳製作所) を連結し、280 nm で検出して行った。カラムは、中圧ガラスカラム (長さ47cm×内径1.4cm, 桐山社) に16g充填剤 (Kiesel gel 60, 230-400mesh, Merck) を乾式で真空で吸引しながら詰めて製作した乾式充填カラムと市販の Prepacked シリカカラム (長さ10 cm×内径2.2cm, 草野科学機器製作所) であった。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、紫外吸収検出器 (SPD-2A) 付き高速液体クロマトグラフ (LC-3A, 島津製作所) を使用し、280nm で検出して行った。分析カラムは、逆相シリカゲル (ODS) カラム (長さ15cm×内径0.46cm, ガスクロ工業) であり、プレカラム (長さ1.0cm×内径0.65cm) として、Deverosil (野村科学) を詰めたものを用いた。これらのカラムは、46℃に加温して分析をした。移動相は、アセトニトリル:10 mM KH_2PO_4 (リン酸で pH2.1 に調製したもの) = 15:85の溶液を用いた。

プロトン核磁気共鳴吸収スペクトル (NMR) 測定は、内部標準として、テトラメチルシラン (TMS) を用いて、JEOL FX-100 (日本電子) で測定した。使用した溶媒中に含まれる水のケミカルシフト値は温度可変を行い、この値が移動することで確認した。EI質量分析 (70eVのイオン化エネルギー) では、島津-LKBタイプ9000を用いて行った。Fast atom bombardment (FAB) 質量分析は、島津 GCMS-9020を用い、マトリックスとしてグリセリンを使用し測定した。

方 法

1. ヘミンの酸化

ヘミン (1.7g) に濃アンモニア水 (1.7ml) を加え、さらに水 (170ml) を加え溶かした。この溶液を60℃に加温して、35%過酸化水素水 (43ml), 水 (43ml) 及び濃アンモニア水 (2.5ml) からなる溶液を約20分間かけて加え、1時間60℃に加温し

ながら攪拌した。2 N塩酸 (7ml) を加え酸性にし、沈殿する茶褐色物質を濾過し、濃褐色溶液を得た。

2. エステル化

カルボキシル基をエステル化する目的で、上記の溶液を減圧下で濃縮乾固し、得られた残渣に2 %硫酸-メタノール (250ml) を加え、1時間60℃で加温した。冷後、濃アンモニア水を加え中和し、溶媒を留去して茶褐色残渣を得た。この中に含まれる目的物質を、酢酸エチルで60℃で加温しながら抽出した。この操作を4回繰り返した。抽出液 (約50ml) に無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した後、蒸発乾固し残渣を得た。酢酸エチル (5 ml) に溶かし、n-ヘキサン (5 ml) 加え、沈殿する茶褐色物を濾過し、多くの不純物を除いた。

3. 中圧カラムによる精製

1) 乾式充填カラムによる方法

上記のように調製した乾式充填カラムに、n-ヘキサン:酢酸エチル:メタノール (300:300:7.5) の溶液を通過して平衡化した。上記の濾液をカラムに加えクロマトグラフィーを行った。2ml/minの流速で、1フラクションあたり12mlを集めた。各フラクションに Stokvis 試薬を加え、ピンクに発色する陽性な25番から35番までのフラクション (図2参照) を集め、濃縮乾固し、黄色油状物質を得た。

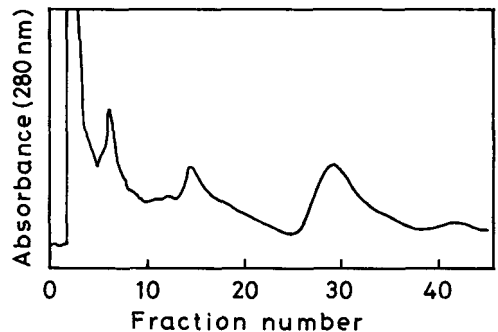


図2 メタノールプロペントダイオペンンジメチルエステル (MPDP) の分取カラムクロマトグラム 充填剤, シリカ; 移動相, n-ヘキサン:酢酸エチル:メタノール (300:300:7.5) の溶液: 流速 2 ml/min; 1フラクション=12ml, その他の条件は方法の項参照。

2) Prepacked カラムによる方法

カラムに5%メタノール-酢酸エチルの溶液を通過して平衡化した。上記の濾液を加え、クロマトグラフィーを行った(1 ml/minの流速)。上記と同じように、Stokvis 試薬に対して陽性を示す淡黄色フラククション(36分前後に溶出するフラククション)を集め(クロマトグラム省略)、濃縮乾固し、淡黄色油状物質を得た。

4. 再結晶

油状物質を酢酸エチルに溶かし、シリカゲルなどの不溶物は濾過し除いた。濾液を濃縮乾固し、残渣についてメタノールから再結晶を行い、白色柱状結晶を得た。もう一つの方法として、残渣を加温して酢酸エチルに溶解し、等容のn-ヘキサンを加え、1夜放置し白色結晶を得た。乾式充填カラムからのものは不純物が多く、これらいずれの再結晶法でも4-5回繰り返す必要があった(ヘミンからの収率、約1%)。一方、Prepacked カラムからのものは純度が高く、いずれの再結晶法でも1回で満足な純度をもつ目的物質が得られた(ヘミンからの収率、約2%)。

結 果

MPDP について、純度と確認試験を行った。

1. 融点、元素分析および HPLC

mp. 157-164°C。元素分析, $C_{20}H_{26}O_7N_2$ (MW: 406.44)

計算値: C, 59.10; H, 6.44; N, 6.89%。実測値: C, 58.62; H, 6.50; N, 6.86%。HPLC のクロマトグラムを図3に示す。対称性のよいピークで、他のピークは認められなかった。

2. TLC

ベンゼン: 酢酸エチル (3:7) の溶液と酢酸エチル: 酢酸 (20:1) の溶液の2種を用いて行った結果、それぞれ Rf 値 0.23 と 0.65 を示し、他のスポットは観察されなかった。これらのスポットに Stokvis 試薬を噴霧すると、ピンクに発色し PDP 特有の反応を示した。

3. UV スペクトル

メタノール溶媒で278nm付近に最大吸収値があった。この波長での分子吸光係数は 29.8mM^{-1} 。

cm^{-1} であった。

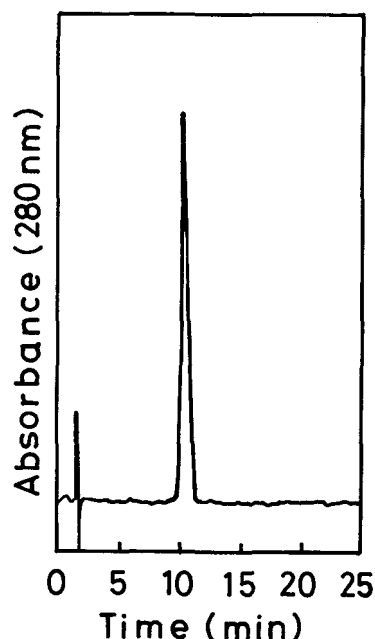


図3 メタノールプロペントダイオペントジメチルエステル (MPDP) の高速液体クロマトグラム移動相, アセトニトリル:10mMKH₂PO₄(リン酸で pH2.1に調製したもの)=15:85; 検出, 280nm; 流速, 1.0ml/min: 約2分にあるシグナルは試料注入時に入った空気を示す。

4. プロトン NMR スペクトル

測定結果を表1に示す。ピロール窒素に結合するプロトン以外はすべて観測された。

5. EI 質量分析

つぎのような分子イオンや、そのフラグメントが検出できた。m/z (相対強度): 406 (M^+ , 83), 391 ($M^+ - \text{CH}_3$, 68), 375 ($M^+ - \text{OCH}_3$, 100)。

6. FAB 質量分析

図4に示すように、 $M^+ - \text{OCH}_3$, $M^+ - \text{CH}_3$ および $(M+H)^+$ にそれぞれ相当する m/z 375 (ベースピーク), 391および407のシグナルが観測された。

表1 メタノールプロペントダイオペンジオメチルエステル (MPDP) のプロトン NMR (溶媒: 重アセトン)

Protons	Number of hydrogen	Chemical shift (ppm)
Methene	1H	5.01 (s)
Ester methyl	6H	3.61 (s) and 3.62 (s)
Valley methoxy	3H	3.19 (s)
Methylene in propionic acid	8H	2.52-2.77 (m)
Arylmethyl	6H	1.81 (s) and 1.83 (s)

s は singlet を, m は multiplet を示す。H₂O が 2.8 ppm 付近に, 溶媒の不純物が 2 ppm 付近に観測された。

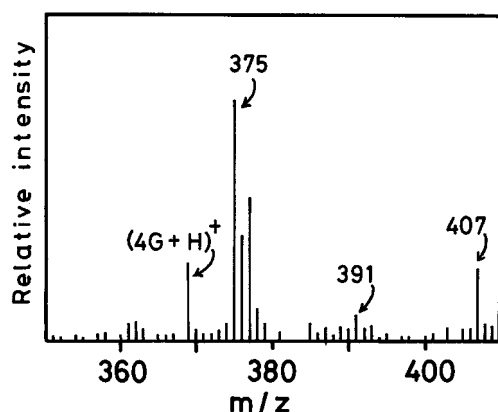


図4 FAB 質量分析
(4G+H)⁺は, マトリックスとして用いたグリセリンのプロトン化テトラマーを示す。

考 察

ここで得られた MPDP について種々分析した結果, 純度が高く図1の構造であることが確認された。この化合物は, PDP に特異的に発色する Stokvis 反応に陽性であり, UV 領域の最大吸収値も, 今までに報告されている PDP に酷似するものであった⁶⁾。展開後に紫外線ランプを照射すると, 青白い蛍光を示し PDP の特徴を示した。TLC および HPLC による分析では, 目的物質以外のものを検出できなかった。プロトン NMR の結果は, 既に報告されている値⁵⁾にほぼ一致した。FAB および EI 質量分析の両方で, 分子量に相当

するシグナルとそのフラグメントが観測され, MPDP の構造が確認できた。

ヘミンからの合成収率は, 2%以下で低かった。ヘミンに対して, 過酸化水素量をここで用いた量の1/2と2倍に変えても, また精製に用いるカラムを変えても, 収率を大きく改善することができなかった。収率の低さは, 過酸化水素によって選択的にヘミンのプロトポルフィリン環 (図5参照) のβ-とδ-位メテン基の両方で, 酸化的に開裂してないものと思われる。事実, この他に環のα-およびγ-位メテン基で開裂した PDP が, 過酸化水素や酵素を用いる酸化反応によって生成することが報告されている⁵⁾。

また, PDP のジピロールのみならず開裂の箇所と数によって, 開環テトラピロール, トリピロール, モノピロールなどが生成している可能性も報告されている^{5),7)}。事実, ヘミンの酸化後の溶液は強く褐色を呈しており, 多種多様の成分を含んでいた。硫酸-メタノール溶液処理後の抽出液を TLC 分析した結果, 少なくとも10個以上の目的物質以外の成分が含まれていた (データ省略)。

上述の2種のカラムを用いしないで再結晶を繰り返しても, 決して結晶化し純化することはできなかった。ここでは自製の乾式充填カラムと市販の Prepacked カラムの2種を使用した, 後者は収率の点で良好で, 再結晶も簡単であるが, このカラムの高価なことが欠点といえる。

メタノールが付加していないジピロール物質, 即ち PDP の単離を試みたが, 不安定で純化するこ

とが困難であった。しかし、これに代わる MPDP の標品が得られる合成法がここに確立したので、フェニルヒドラジンによるヘモグロビンヘムの酸化的分解反応³⁾の研究が容易になり、溶血機構の解明が進むものと期待できる。

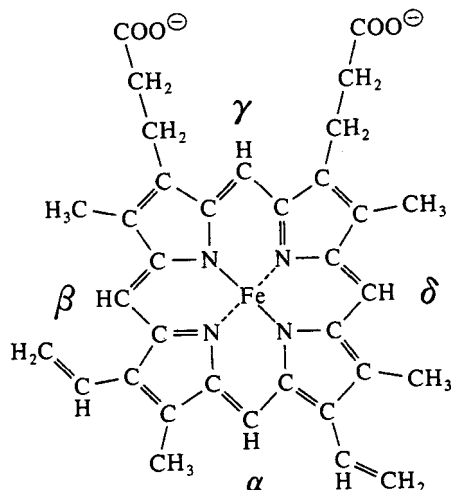


図5 ヘムの構造と酸化的開裂部位

謝 辞

NMR スペクトル測定をして頂いた岡山大学工学部宇高正徳並びに酒井貴志両先生に、そして、FAB 質量分析をして頂いた岡山大学医学部共同

実験室の皆様にご感謝いたします。

文 献

- 1) Lightner, D.A.: Propentdyopents and pentdyopents; in *The porphyrins*, Vol. 6, Dolphin, D. ed, Academic Press, New York and London; 1979, pp574-577.
- 2) Bergsma, D.: Bilirubin metabolism of the newborn; Hsia, D.Y.-Y. and Jackson, C. eds, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1970
- 3) Hirota, K., Yamamoto, S. and Itano, H.A.: Urinary excretion of isomers of biliverdin after destruction in vivo of haemoproteins and heamin. *Biochem. J.* 229: 477-483, 1985
- 4) Hirota, K., Hatanaka, T. and Hirota, T.: Isolation of N-phenylprotoporphyrin IX from the red cells and spleen of the phenylhydrazine treated rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 42-47, 1987
- 5) Schaefer, W.H., Harris, T.M. and Guengerich, F.P.: Characterization of the enzymatic and nonenzymatic peroxidative degradation of iron porphyrins and cytochrome p-450 heme. *Biochemistry* 24: 3254-3263, 1985
- 6) Guengerich, F.P.: Destruction of heme and hemoproteins mediated liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphatecytochrome P-450 reductase. *Biochemistry* 17: 3633-3639, 1978
- 7) 廣田和弘, 佐々木健二, 廣田喬: 赤血球中のヘモグロビンヘムの酸化開裂物質ヘマチン酸の定量, 岡山大学医療技術短期大学部紀要, 1: 77-82, 1990

要 約

2つのピロール環上に2個のカルボキシル基をもつプロペントダイオペントのジメチルエステルのメタノール付加物を、ヘミンの過酸化水素酸化と硫酸-メタノール溶液によるエステル化により合成した。精製はシリカゲルの分取カラムクロマトグラフィーと再結晶で行った。純度は薄層クロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーによって、構造は質量分析と核磁気共鳴吸収スペクトルによって確認した。

(1991年10月30日受理)